

A találmány tárgya eljárás a keringési rendszer és a szív tromboemboliikus állapotaira ható gyógyászati készítmény előállítására.

Ismeretes, hogy a C₁₈₋₂₄ ω-3 telítetlen zsírsavak előnyös biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Közülük is kiemelkedő jelentőségű az eikozapentaénsav /EPA/ és a dokozahexaénsav /DHA/. E két sav fontosságára és sokrétű biológiai hatására mutatnak rá közleményükben Dyerberg és munkatársai (The Lancet, 15, 117/1978).

A politelítetlen zsírsavak, ezen belül elsősorban az EPA és a DHA hiperlipidémiában és trombózisos megbetegedésekben játszott fontos szerepével kapcsolatos hatásokat írják le összefoglaló jelleggel Goodnight és munkatársai (Arteriosclerosis 2, 87/1982/Review).

Hatóanyagként EPA-t és DHA-t tartalmazó gyógyszerkészítményeket ismertet például a 3 438 630 sz. német szabadalmi leírás elsősorban a vér kolesterinszintjének csökkentésére, továbbá az 5 808 037 és a 6 049 097 sz. japán közrebocsátási iratok szívbetegségben szenvedőknel trombus kialakulásának megelőzésére és agyérelmeszesedés ellen.

Számos közlemény foglalkozik még az EPA és a DHA vérelemekké aggregációját és így trombusképződést gátló hatásával, így például Spencer és Caranga (Prostagl. Leukotrienes and Med. 23, 129/1986) és Knapp és munkatársai (New Engl. Journ. of Med. 314, 937/1986).

Az EPA és a DHA vírusellenes hatását ismerteti a 4 513 008 sz. USA-beli szabadalmi leírás.

A halolaj aktív komponensei, így az EPA és a DHA a PG-3 sorozat bioszintézisének prekurzoraként szerepelnek, egyben gátolják az arachidonsavból kiinduló bonyolult biokémiai folyamatok láncolatát, az ún. „arachidonsav-kaszád” során keletkező káros hatású metabolitok, mint például a TXA₂ és a TXB₂ képződését.

A politelítetlen zsírsavak számos kedvező hatás mellett azzal a hátrányos patológias tulajdonsággal rendelkeznek, hogy az emberi szervezetben spontán oxidációs mechanizmusú bomlást szenvednek aktív aldehidek, többek közt a szervezetre káros malonaldehid keletkezése közben. Ezek az aldehidek elsősorban a kötőszövetekkel élettanilag káros reakciókba léphetnek, ami ún. „ceroid lipofuscinosis”-hoz vezethet.

Az utóbbi évtizedben kezdtek foglalkozni a kutatók a mikroelemek és nyomelemek élettani hatásával. Így ismeretessé vált, hogy a szelén az élet egyik legfontosabb, nélkülözhetetlen anyaga. A szelén kedvező hatása főként azon alapszik, hogy aktiválja a glutation-peroxidázt, pontosabban annak prosztetikus csoportját, amely a káros peroxidációs folyamatok legfontosabb endogén gátlója.

A szelén önmagában hatásos vérnyomáscsökkentő anyag. javítja a szív isémiás, hipoxiás és infarktusos állapotát, megakadályozza a központi idegrendszer ceroid lipofuscinosisát. Hatásos periodonütis /foggyókérgyulladás/ esetén is. Rákellenes hatása jelentős, bizonyítottan csökkenti a rák kialakulásának lehetőségét. Ezenkívül mutagén inhibitorként is alkalmazható.

A szelén nem kumulálódik a szervezetben, így pótlásáról állandóan gondoskodni kell. Bevitelc mostanáig

főleg szervetlen vegyületek, így SeO₂ és Na₂SeO₃ alakjában történt. Hiánya májnekrozist, izomelhalást, eritrocita membrán destruktíót, kötőszöveti károsodást eredményezhet. EKG elváltozásként S-T elevációt, ezenkívül kwashiorkor betegséget, sclerosis multiplexet okozhat.

A szelén biológiai hatásairól összefoglaló cikket közölnek Thressa és munkatársai (Nutrition Review 35, 7/1977), valamint Shamberger (J. of Env. Path. and Tox. 4, 305/1980) és Masukawa és munkatársai (Experientia 39, 405/1983).

Szerves szelén-vegyületet egyrészt preparatív szintetikus úton nyerhetünk; ilyen megoldást ismertetnek például Klaiman és Günther: Organic Selenium Compounds, Their Chemistry and Biology /John Wiley and Sons, Inc. New York; 1973/ c. könyvükben, de előállíthatók szerves szelén-vegyületek mikroorganizmusok segítségével is. Utóbbi esetben a mikroorganizmusokat szerves szelén-vegyülettel dúsított tápközegeben nevelik. Az erre alkalmas szervezetek a szelént felveszik és azt anyagcseréjükbe vonva szerves anyagokhoz, leggyakrabban aminosavakhoz vagy zsírokhoz kötik. Ilyen eseteket ismertetnek közleményeikben Danch és Chmielewsky (Pr. Nauk. Univ. Slask Katowich 1, 57/1985) és Gennity és munkatársai (Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 176/1984).

Számos olyan mikroorganizmus ismertetes, amely képes egyes elemeket – így a szelént is – környezetéből összegyűjteni és szervezetében akkumulálni. A 4 530 846 sz. egyesült államokbeli szabadalmi leírás és a 60 224 451 sz. és 57 174 098 sz. japán közrebocsátási iratok szelénrel dúsított élesztőgomba előállítását írják le.

Az élesztő mellett egyéb mikroorganizmusok, így baktériumok, sugárgombák és fonalgombák szelénrel való dúsítását ismerteti a 78 148 587 sz. japán közrebocsátási irat.

A szelén tartalmú élesztőt az 58 129 954 sz. japán közrebocsátási irat szerinti növényi olajokhoz keverve öregkori megbetegedések kezelésére javasolják.

A találmány célja olyan új, a szívre és keringési rendszerre ható gyógyászati készítmény előállítása, mely lehetővé teszi a DHA és az EPA, valamint speciális mikroorganizmusok közreműködésével a szerves szelén-tartalmú természetes vegyületek előnyös tulajdonságainak egyesítését, és egyidejűleg teljes mértékben kiküszöböli a politelítetlen zsírsavak hátrányos tulajdonságait.

A találmány alapja az a felismerés, hogy a fenti cél maradéktalanul elérhető, és a ceroid lipofuscinosisos folyamat kiküszöbölésére alkalmas készítmény nyerhető, ha szelén-tartalmú – humán felhasználás szempontjából nem-toxikus – mikroorganizmust politelítetlen zsírsavakkal együtt alkalmazunk.

A fentiek alapján a találmány eljárás a szívre és a keringési rendszerre ható gyógyászati készítmények előállítására. A találmány értelmében úgy járunk el, hogy 0,5–50 tömeg% szeléntartalmú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg% 18–24 szénatomos,

legalább két telítetlen körezt tartalmazó zsírsavakat vagy ezek származékait kívánt esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánsal önmagában ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítottunk.

A találmány szerinti eljárással célszerűen olyan készítményeket állítottunk elő, melyek eikozapentaénsavat /EPA/ és dokozahexaénsavat /DHA/, valamint szeléntartalmú élesztőt tartalmaznak.

A készítmény egyik komponenséül szolgáló C_{18-24} ω -3 telítetlen zsírsavak alapanyagaként különböző tengeri és édesvízi halakból, így elsősorban makrélából, tőkehalból, heringből, szardíniából, tintahalból és busából, továbbá a halak májából nyerhető olajok, például a tőkehalolaj /esukamájolaj/ és cápaolaj használhatók.

A halolajok az EPA-n és a DHA-n kívül nagy mennyiségben tartalmaznak telített és kismértékben telítetlen zsírsavakat, valamint el nem szappanosítható komponenseket. Ezen alkotórészek eltávolítása igen fontos, hiszen a halolajokból készített gyógyászati készítmények dózísának növelése érzékenyen emelné a bevitt kalóriát, valamint a vér triglicerid-szintjét. Emellett az el nem szappanosítható alkotórészek tartalmazhatnak szteroidokat, például koleszterint, D-vitamint /annak provitaminját/ és/vagy A-vitamint. A D- és az A-vitaminok az emberi szervezetben kumulálódnak, így az ilyen vitaminokat tartalmazó készítménnyel nem lehetne a kívánatos hatás eléréséhez szükséges tartós kezelést végezni. Ezért a halolajból eltávolítjuk a felsorolt alkotóelemeket, így a telített és kismértékben telítetlen zsírsavakat, az el nem szappanosítható alkotóelemeket, mint például a koleszterint, az A- és D-vitamint. Így módon a halolajban az EPA és DHA együttes mennyisége 50% fölé dúsul.

Mikroorganizmusként célszerűen olyan törzseket használhatunk, amelyek humán szempontból nem toxikusak, és így emberi fogyasztásra alkalmasak. Erre a célra legmegfelelőbbek a biotechnológiában is széles körben alkalmazott törzsek, mint például a *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Acetobacter* sp., *Streptococcus* sp., *Torula* sp., *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Brevanomyces* sp., *Brevibacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Oidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichospora* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Monascus* sp., *Aspergillus* sp. stb. törzsek fajtái.

A találmány szerinti készítmény oxidációjának gátlására aktív tartósítószerként α -tokoferolt /E-vitamin/, glutationt vagy hagyományos antioxidánsokat, mint például butil-hidroxitoluolt célszerű használni.

Vivő- és hordozóanyagként a gyógyszerkészítésben szokásos anyagokat, mint például laktózt, keményítőt vagy magnézium-sztearátot alkalmazhatunk.

A farmakológiai vizsgálatok a készítmény egészséget károsító mellékhatásoktól való mentességét igazolták, mert a patkánymáj mikroszomális enzimrendszerében használatos dózis százszoros mennyiségénél sem tapasztaltunk elváltozást. A készítménnyel történő kezelés szignifikáns módon csökken a kontrollhoz

viszonyítva a szervezetben felhalmozódó lipofuscin mennyiségét. A találmány szerinti készítménnyel Wistar nőstény patkányokon végzett 6-hetes vizsgálatok alapján egyértelmű trombocita aggregáció gátlást tapasztaltunk.

A készítmény optimális hatásos napi dózisa 75 kg-os átlagos testtömegre számolva 2 g. Az olaj-komponens átlagosan 22% EPA-t és 43% DHA-t tartalmaz. Az élesztőpor grammonként átlagosan 40 μ g szelént tartalmaz.

A találmány szerinti készítmény főbb előnyei a következők:

1. Egyesíti az EPA és a DHA, valamint a szelén és az élesztő előnyös tulajdonságait.

2. Kiküszöböli az ismert halolajtartalmú készítmények azon káros hatásait, melyeket a telített lipid komponensek, például szterinek, valamint az A- és D-vitamin tartalom okozhat.

3. Kiküszöböli a politelítetlen zsírsavak fogyasztása esetén fellépő „ceroid lipofuscinosis” lehetőségét.

4. A szelént természetes anyagként mikroorganizmusban, mint pl. baktériumban, gombában, élesztőben feldúsítva tartalmazza, speciális mikroorganizmussal együtt adagolt szelén jobban felszívódik, és kedvező hatását előnyösebben fejti ki.

5. A szerves szelén mikroorganizmusokban így elsősorban élesztőben ipari méretekben, fajlagosan nagy mennyiségben és olcsón állítható elő.

6. Kedvező gyógyászati hatást fejt ki atopikus zavarok esetén, és ekcéma, asztma, allergiás tünetek, allergiás rhinitis és/vagy atopikus összefüggésű zavarok, például migrén, Crohn-féle betegség, fekélyes colitis, otitis media, nefritikus szindróma, cukorbetegség preventív kezelésére is felhasználható. Különösen alkalmas a keringési rendszer zavarai, annak apoplexiás megnyilvánulásai, trombo-embolikus állapotok, így agyvérzés, infarktus, fiatalokúak Keshan-szindrómája kezelésére, valamint a rendellenes állapotok kialakulásának megelőzésére.

A találmány szerinti készítményhez alkalmazott ω -3 politelítetlen zsírsavakat az 1. példában leírtak szerint, a szelénrel dúsított mikroorganizmust pedig a 2-6. példák szerint állíthatjuk elő. A 7-9. példák a találmány szerinti gyógyászati készítmények előállítását szemléltetik.

1. példa:

24 kg makréla olajat 60 °C-on feloldunk 16 liter metanolban 50-60 °C közötti hőmérsékleten, keverés közben 8 kg 40%-os NaOH oldatot csepegtetünk hozzá, majd az elegyet 60 °C-on tartva további 45 percig kevertetjük. Mintegy 60 °C hőmérsékleten 20 kg 15%-os sósavat adunk az oldathoz. A fázisokat elválasztjuk, majd a szerves fázist még 10 kg 15%-os sósavval, utána mintegy 180 liter forró csapvízzel semlegesre mossuk. Az így kialakult fázisokat ismét elválasztjuk. Az olajos fázishoz 100 liter acetont adunk, felmelegítjük mintegy 45 °C-ra, és hozzáöntünk 30 liter vízben feloldott 3,8 kg $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ -ot. Fél óra keverés után éjszakán át állni hagyjuk, majd leszűrjük, és az aceto-

nos szűrletet bepároljuk. Körülbelül 8 kg 15%-os só-savval megsavanyítjuk és hexánnal háromszor kímé-
zük, majd a hexános fázist bepároljuk. A tisztítási mű-
velet során végig N_2 -atmoszférában dolgozunk. Így 6,4
kg tisztított halolajat nyerünk.

Az így tisztított makrélalaj 1 kg-ját 60 °C-on hoz-
zásepegtetjük 3 kg karbamid 9 liter metanolal készí-
tett oldatához. Az elegyet 2 órán át ezen a hőmérsékle-
ten keverjük. Lehűlés után éjszakán át mélyhűtőben
-10 °C-on állni hagyjuk, majd leszűrjük, és a szűrletet
bepároljuk. A bepárolt anyaghoz 2,5 liter 1:1 higítású
sósavat öntünk, és 15 percig keverjük. Hexánnal kímé-
zük, a hexános fázist vízzel semlegesre mossuk.
 Na_2SO_4 -tal szárítjuk, majd bepároljuk. Így 0,34 kg ω-3
telítetlen zsírsavat kapunk. Jódszám: 315; EPA-tarta-
lom: 24%; DHA-tartalom: 42%.

2. példa:

5-literes üveg palackokba 2-2 l sterilizált malákti-
vonatos folyékony táptalajt öntünk, és glükózzal 13%
dúsítjuk 5 µg/ml nátrium-szelenitet teszünk hozzá,
majd beoltjuk *Saccharomyces cerevisiae*-vel. Levegőze-
tetéssel 32 °C-on 72 óráig neveljük. A 48. órában újabb
5 µg/ml nátrium-szelenitet adunk a tenyészetbe.

Szűrés után a sejteket desztillált vízzel többször
átmossuk, majd 68-70 °C-on szárítjuk. Az anyagot
mikronizáljuk, majd atomabszorpciós módszerrel meg-
határozzuk a Se-tartalmat. A kapott érték 300 µg/g.

3. példa:

500 ml-es Erlenmeyer-lombikokba 100 ml élesztő-
kivonatos folyékony tápoldatot töltünk steril körülmé-
nyek között, majd 5 µg/ml mennyiségű Na-szelenitet
teszünk bele, és beoltjuk *Aspergillus sojae* gombával.
28-30 °C-on rázatjuk a tenyészeteket. A tenyésztés 3.
napján újabb 5 µg/ml Na-szelenitet teszünk a kultúrá-
ba. 5 nap eltelte után a szárazanyagot kiszűrjük, mos-
suk, majd a 2. példa szerinti módon szárítjuk. Mikroni-
zálás után a minta módszeresen meghatározott Se-tarta-
lma 300 µg/g.

4. példa:

A 3. példával azonos módon alkalmazzuk a *Tori-
loopsis utilis* nevű élesztőt. A tenyésztés során nyert
mikrobatömeg Se-tartalma 120 µg/g.

5. példa:

A 3. példa szerinti módon elkészített tápoldaton
Streptococcus thermophilus-t nevelünk 45 °C-on. A
nevelési és kinyerési periódus után a mikroba-por Se-
tartalma 420 µg/g.

6. példa:

A 3. példával azonos módon neveltünk *Lactobacil-
lus mesenteroides* baktériumfajt. Ez esetben a táptalajt
1% glükózzal és 2% kalcium karbonáttal is kiegészít-
jük. A kapott baktérium 300 µg/g Se-t tartalmaz.

7. példa:

150 g 65%-os dúsított makrélalajhoz /EPA-tarta-

lom: 24%, DHA-tartalom: 42%/ 10 g Se-élesztőpor
keverünk /Se-koncentráció: 260 µg/g élesztőpor/. A ke-
veréket homogenizáljuk. A homogenizátumot 0.1% E-
vitaminnal tartósítjuk. A kapott hatóanyagot lágy zselati-
n gyöngy kapszulába vagy lágy zselatin kapszulába
töltjük, és buborék-csomagolással szereljük ki.

8. példa:

Mindenben a 7. példa szerint járunk el, azzal az
elkéréssel, hogy az alábbi kiindulási anyagokat használ-
juk: 400 g 65%-os dúsított tőkehalolaj, melynek
EPA tartalma 22%, DHA-tartalma 43%; 100 g élesztő-
por 120 µg/g Se-tartalommal és 0.4 mg E-vitamin. A
homogenizátumot 500 mg hatóanyag befogadására al-
kalmas kapszulába töltjük.

9. példa:

Ismert gyógyszerészeti eszközökkel és eljárással az
alábbi összetételi tablettákat állítjuk elő:

EPA-ra és DHA-ra nézve dúsított tőke- halmáj olaj, mely 0,1% E-vitamin tar- tósítószerrel tartalmaz (DHA-tartalma: 43%, EPA-tartalma: 22%)	200,0 mg
Se-élesztő (Se-koncentráció: 150 µg/g élesztőpor)	86,0 mg
Laktóz	140,0 mg
Keményítő	60,0 mg
Polivinil-pirrolidon	3,5 mg
Magnézium-sztearát	3,5 mg.

Kívánt esetben a tablettákat drázsírozó gépen cu-
korról vagy más anyaggal vonjuk be.

A trombocita aggregáció gátló hatást Wistar albi-
no nőtény patkányok 10-es csoportjain 6 hetes p. o.
kezeléssel vizsgáltuk. Az állatok I. csoportja 67%
zsírsav-származék és 33% élesztő (Se-tartalom:
240 µg/g) keverékét, a II. csoport 94% zsírsav-szár-
mazék és 6% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g), a III.
csoport 50% zsírsav-származék és 50% élesztő (Se-
tartalom: 240 µg/g) keverékét kapta. A IV. (kontroll)
csoport 67% fiziológiás sóoldat és 33% élesztő (sze-
lén-mentes) keveréket kapta.

A 6 hetes-kezelést követően a vena cava inferiorból
vért vettünk, a vérmintákat 3,5%-os Na-citrátal össze-
kevertük, centrifugáltuk és a kapott, trombocita-dús
plazmában, ADP különböző koncentrációval tromboci-
ta aggregációt idéztünk elő. Azt a minimális ADP-kon-
centrációt, melynél az aggregáció jelentkezik, ADP kü-
szöb-koncentrációnak nevezzük. Ennek átlagos értéke
(\bar{X}) a kontroll-csoportban 11,1 µ; a találmány szerinti
kombináció hatására ez jelentősen emelkedik, mint azt
az alábbi táblázat mutatja:

	\bar{X} (µM)
I. csoport	64,5
II. csoport	52,3
III. csoport	88,5
IV. (kontroll) csoport	11,1.

A trombocita aggregáció gátló hatás jelentős, és
50-94% zsírsavat (vagy zsírsav-származékot) és 33-
50% élesztőt (Se-tartalmú élesztő) tartalmazó kombi-
náció esetében megfelelően bizonyított.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a szív és a keringési rendszer tromboembolikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,5–50 tömeg%, előnyösen 5–35 tömeg%, célszerűen 15–25 tömeg% szelén-tartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg%, előnyösen 95–65 tömeg%, célszerűen 85–75 tömeg% 18–24 szénatomos, legalább két telítetlen kötést tartalmazó egy vagy több zsírsavat és/vagy ezek származékait kívánt

5

10

esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánssal önmagában ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként tengeri halak olajából extrahált zsírsavakat használunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként 5,8,11,14,17-eikozapentaénsavat és 4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsavat használunk.